

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN BOVINOS PERTENECIENTES A 3 BIOTIPOS: HEREFORD, 3/8 HEREFORD Y 5/8 CEBÚ VACUNADOS CON *B. ABORTUS* CEPA RB51 EMPLEANDO EL TEST DE POLARIZACIÓN FLUORESCENTE (FPA)

Draghi, M.G.¹, Conde S.², Piazza, E.², Schust, M.², Samartino, L.E.² y Biotti, G.M.¹. 2010. Vet. Arg. 27(266).

¹ Sanidad animal EEA Mercedes, Corrientes, Argentina mgdraghi@correo.inta.gov.ar

² Instituto de Patobiología, CICV y A Castelar Argentina.

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Enfermedades y problemas reproductivos](#)

RESUMEN

Se seleccionaron 30 terneras Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú que fueron vacunadas a los 5 meses con *B. abortus* cepa 19 y revacunadas a los 18 meses de edad con *B. abortus* cepa RB 51.

Los animales se sangraron desde el día 0 (vacunación) a los 7, 15, 21, 30, 45, 60 y mensualmente hasta los 210 días PV.

Se empleó la técnica de Polarización Fluorescente con antígeno rugoso para medir los anticuerpos circulantes. Empleando el test de Polarización Fluorescente todos los animales fueron negativos a los 180 días posvacunación.

Palabras clave: brucelosis, serología, *Brucella abortus*, cepa RB51, FPA.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecto contagiosa producida por *Brucella abortus*, una bacteria intracelular facultativa que afecta a los animales y al hombre. En bovinos, la enfermedad se caracteriza por producir abortos, retención de placenta, orquitis, epididimitis, infertilidad y graves daños económicos debido a las pérdidas de terneros y disminución en la producción láctea.

La vacunación es la medida más eficaz para la prevención de la brucelosis bovina. Actualmente en el mundo se emplean dos vacunas, la *B. abortus* cepa 19 y la *B. abortus* RB51(10).

La cepa 19 es una vacuna lisa viva atenuada naturalmente protege a los bovinos contra la infección, sin embargo cuando se aplica a animales adultos es capaz de producir persistencia de anticuerpos que interfieren las pruebas diagnósticas (6).

Se sabe que aplicada correctamente la vacuna elaborada a base de la cepa 19 confiere un 70% de protección contra el aborto y un 55% contra la infección.

En la República Argentina, recién a partir de la resolución 73/82 se implementó la vacunación obligatoria en todo el país prohibiéndose la vacunación de animales adultos y machos de cualquier edad (7).

Los problemas de persistencia de anticuerpos después de la vacunación con cepa 19 son mayores en las pruebas de aglutinación que con la FC (6). A su vez los problemas son mayores cuando los animales son vacunados de adultos aunque los títulos de FC disminuyen a los 6 meses posvacunación Durante la década del 80, se desarrolló en Virginia Tech-USA, una vacuna viva a partir de la cepa virulenta 2308 de *Brucella abortus* (14). Esta vacuna denominada RB51, es una cepa viva rugosa rifampicina resistente de *Brucella abortus*. Esta cepa rugosa tiene un LPS sin la cadena O, por lo tanto no da títulos de anticuerpos que puedan ser medidos por los métodos convencionales (13).

Los distintos estudios realizados permitieron comprobar tanto en animales de laboratorio como en bovinos que esta cepa era capaz de generar una protección similar a la conferida por la cepa 19, no inducir respuestas serológicas que interfieran con los test de diagnóstico, aún en el caso de que los animales recibieran más de una dosis, que era estable, es decir no revertía a la patogenicidad.

En Argentina, en el año 1998 se autorizó provisoriamente su uso en hembras mayores de 10 meses de edad, bajo condiciones controladas (Resolución 69/98).

Para la detección de los anticuerpos generados por la cepa de *B. abortus* RB51, Adone et.al. desarrollaron una prueba de fijación del complemento con la cepa rugosa completa (1, 2, 3).

Conde y col sugirieron que lo más promisorio era la prueba de polarización fluorescente con antígeno rugoso (4). Esta prueba permitiría detectar específicamente los anticuerpos inducidos por la vacuna RB 51(8, 9, 12). El objetivo del presente trabajo fue detectar anticuerpos producidos luego de la vacunación con *B. abortus* cepa RB51 empleando el test de anticuerpos fluorescentes antígeno homólogo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se vacunaron 30 de terneras a los 5 meses de edad pertenecientes a los biotipos Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú con 2 ml de *B. abortus* cepa 19 conteniendo 15 a 30×10^9 células viables y a los 18 meses con 2 ml de *B. abortus* RB51 conteniendo entre 10 y 34×10^{10} células viables.

Los animales se sangraron por venopunción yugular los días 0, 7, 14, 21, 28, 45, 60 y luego cada 30 días hasta el día 210 postvacunación (PV). Los sueros fueron centrifugados y conservados a -20°C hasta su procesamiento.

Las pruebas empleadas fueron: antígeno bufferado en placa (BPA); seroaglutinación en tubos (método de Wright); 2 – mercaptoetanol; fijación del complemento en placa; enzoinmunoensayo indirecto, enzoinmunoensayo de competición y prueba de polarización fluorescente (FPA) con antígenos elaborados a base de *B. abortus* cepa 19 y un FPA con antígeno elaborada con *B. abortus* cepa RB51.

Para esta última prueba se utilizaron 960 ul de un buffer fosfato 0.01 Molar pH 6.8 y 40 ul de suero, se homogeneizaron las muestras se realizó la primer lectura en un polarizador (Sentry FP) para medir autofluorescencia de los sueros. Se agregaron 20ul de antígeno (LPS de RB51 conjugado con isotiocianato de fluoresceína). Se homogeneizaron nuevamente, se incubaron 2 minutos y se realizó la lectura final. Los resultados fueron expresados en unidades de millipolarización (mP). El valor de corte fue de 90 mP.

El antígeno y los sueros controles (positivos y negativos) fueron suministrados por el Dr. Klaus Nielsen del Animal Disease Research Institute, Nepean, Ontario, Canadá.

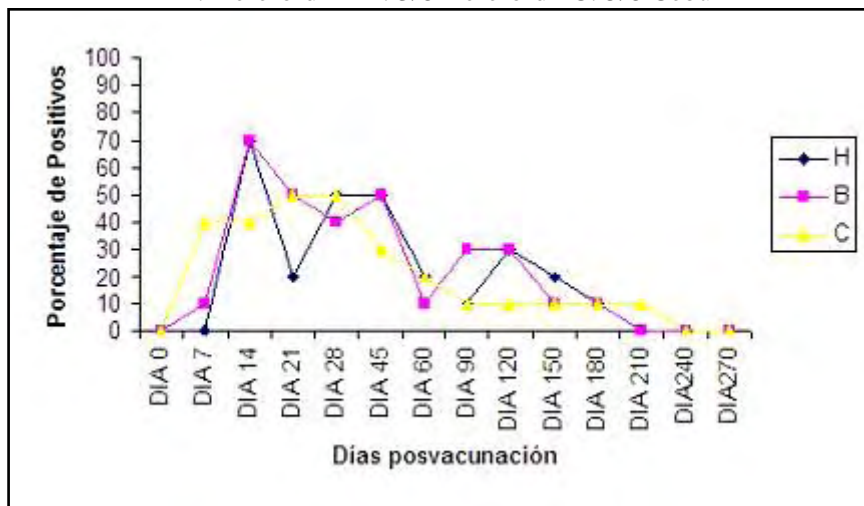
RESULTADOS

La única técnica capaz de detectar anticuerpos fue el test de polarización con antígeno rugoso. En el FPA con antígeno rugoso el día 0 todos los animales presentaron títulos inferiores a 90 mP.

A los 7 días PV 13 animales presentaron valores superiores a los 90 mP, alcanzando el máximo de bovinos positivos a los 28 días PV (18 animales). A partir de los 120 días comenzó a disminuir el número de reactores hasta llegar a los 180 días con sólo un animal positivo.

En el gráfico representa la circulación de anticuerpos en cada uno de los biotipos.

Gráfico N° 1: Persistencia de anticuerpos en bovinos vacunados.
H: Hereford B: 3/8 Hereford C: 5/8 Cebú



DISCUSIÓN

Adone y colaboradores emplearon la prueba de fijación del complemento para evaluar la respuesta de anticuerpos en bovinos y ovinos vacunados con *Brucella abortus* RB51. A pesar del escaso número de animales empleados en el ensayo (7 bovinos y 6 ovinos) los autores concluyen que la FC con el antígeno RB51 puede ser útil para identificar bovinos y ovinos vacunados con *Brucella abortus* RB51 y además es capaz de identificar ovejas infectadas con *Brucella ovis*. Consideran con la prueba podría ser útil también en el hombre.

Sugieren la combinación de antígenos lisos y rugosos para mejorar la eficacia en la identificación serológica de animales vacunados o infectados en los programas de erradicación.

Los mismos autores evaluaron en condiciones de campo la sensibilidad de la prueba de FC con antígeno de *Brucella abortus* RB51. Se testaron 831 sueros de 110 hembras vacunadas y 48 de no vacunadas provenientes de Iowa, USA. Los sueros fueron enviados a Italia donde fueron procesados.

Las terneras tenían 3 a 10 meses cuando fueron vacunadas. La mayoría de los animales recibieron una vacuna con 10^{10} UFC y sólo 6 recibieron una vacuna conteniendo 10^9 UFC.

Empleando las pruebas convencionales no fue posible detectar los anticuerpos generados por la vacuna *Brucella abortus* RB51. Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestra experiencia.

La sensibilidad de la FC fue del 97% en las semanas 2 y 3 posvacunación, disminuyó al 90% hasta la 8va semana y al 65% en la semana 12. La especificidad de la prueba fue del 100. Este trabajo demostró la capacidad de la FC para la detección de animales vacunados.

La detección de anticuerpos usando FPA en cambio fue menor en cuanto a número de reaccionantes pero de similar persistencia en el tiempo.

Tittarelli et. al. midieron la respuesta inmune en terneros vacunados con *Brucella abortus* RB51.

Detectaron anticuerpos el día 6 posvacunación. El nivel de anticuerpos permaneció en los 10 animales vacunados constante por dos meses y luego descendió progresivamente. Todos los animales fueron negativos desde el día 162 hasta finalizar el ensayo a los 300 días. La prueba empleada de Fijación del Complemento sólo mostró un 100% de sensibilidad los días 13 y 14 posvacunación. Esto indicó lo limitado de esta prueba para identificar animales vacunados con RB51.

El test de polarización empleado en nuestro ensayo permitió detectar un máximo de 18 animales positivos a los 18 días. Todos se negativizaron a los 120 días.

Esta prueba sería de utilidad para detectar animales vacunados con *B. abortus* cepa RB 51. A diferencia de lo informado por Conde y col. en trabajos preliminares, no todas las vaquillonas de este ensayo presentaron anticuerpos detectables por la prueba empleada.

Los animales revacunados con *Brucella abortus* cepa RB 51 no presentaron diferencias entre biotipos en cuanto a la persistencia de las reacciones posvacunales.

El test de polarización fluorescente fue el único capaz de detectar reacciones posvacunación. Esto coincide con los datos de Conde y otros quienes evaluaron la capacidad de esta prueba para medir anticuerpos inducidos por la cepa RB51 con la técnica de FPA. Estos autores encontraron que la persistencia de los anticuerpos fue de 6 meses, lo cual es superior a la encontrada en este ensayo donde osciló entre los 90 y 150 días según los biotipos. De acuerdo a los resultados obtenidos y a diferencia de las pruebas convencionales, el test de polarización demostró ser una prueba sencilla, no subjetiva, que permitiría identificar rápidamente los animales positivos a RB51. El presente trabajo fue realizado cuando el uso de vacuna *B. abortus* cepa RB 51 era permitido.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Klaus Nielsen del Animal Disease Research Institute, Ontario, Canadá., por su apoyo y la provisión de reactivos.

Al Dr. Eduardo V. López por suministrar las vacunas para este ensayo.

A la Estadística Laura Jiménez por su colaboración en el análisis de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADONE, R.; CIUCHINI, F. 1999. Complement Fixation Test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.6:787-790.
2. ADONE, R.; CIUCHINI, F.2001. *Brucella abortus* RB51 and Hot Saline Extract from *Brucella ovis* as antigens in a Complement Fixation Test used to detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.1:119 -122.
3. ADONE, R.; CIUCHINI,F.2001. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*.2:385-387.
4. CONDE,S., CAPELLINO, F.,SIERRA, V., PIAZZA E., MARTINEK, L. SAMARTINO, L. Evaluación del test de polarización fluorescente para la identificación de animales vacunados con la cepa RB 51. Resumen presentado en la XIX Reunión científico Técnica de la AAVLD, 13 al 15 de noviembre de 2002, Villa Gral Belgrano, Córdoba.
5. ELLIOT, R.E. W., CHRISTIANSEN, K. 1977 (Eds.) *Brucellosis: A Veterinarian Guide to the literature*. Ministry of Agriculture & Fisheries, Wellington, New Zealand citado por S. Herr.
6. HERR, S., TE BRUGGE, LA. 1985, Profiles of serological reactions following adult cow inoculation with standard dose of *Brucella abortus* strain 19 vaccine.
7. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional de Control y/o Erradicación de la Brucelosis Bovina.1983 Resolución N° 73,.
8. NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN,G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.NICOLLETTI, P; THOMAS,F. 1996 Homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J.Immunol. Methods* 195:161-168.
9. NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M; MASSANGILL, C.A; SAMARTINO, L; PEREZ, B; HENAGER, S.; DAJER, A. NICOLETTI,P; THOMAS, F. 1998 Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol.Immunopathol*.66:321-329.
10. Office International des Epizooties.2004. Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines, Fifth edition, Volume 1 Office International des Epizooties, Paris, France, 464.
11. OLSEN, S,C., EVANS, D., HENNAGER, S.G., CHEVILLE, N.F., STEVENS, M.G.1996, Serological responses of *Brucella abortus* strain 19 calfhood-vaccinated cattle following adult vaccination with strain RB51. *J.Vet. Diagn. Invest.* 8: 451 -454.

12. SAMARTINO, L.E., GREGORET, R., GALL, D., NIELSEN, K. 1999. Fluorescence Polarization Assay. Application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. J. of Immunoassay. 3: 115-126.
13. SCHURIG, G., ROOP R., BURHMAN D., BOYLE, S., BAGHI, T., SRIRANGANATHAN, N. 1991. Biological properties of RB51, a stable, O-chain deficient mutant of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 28, 171-188.
14. STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; PALMER, M.V. 1997. *Brucella abortus* Strain RB51: A new brucellosis vaccine for cattle. The Compendium.
15. TITARELLI, M., BONFINI, B., DE MASSIS, F., GIOVANNINI A., DI VENTURA, M., NANNINI, D., CAPORALE, V. *Brucella abortus* strain RB51 vaccine: immune response after calfhooed vaccination and field investigation in Italian cattle population. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del molise G. Caporale, Campo Boario, 64100 Teramo, Italy.
16. VILLA, L. J.; GONZÁLEZ TOMÉ, J.; MANETTI, J; RAMIS, C.R. ZAMORA, A. 1986. Análisis y evaluación de la metodología de diagnóstico, prevención y control de la brucelosis. Informe producido por la Comisión Científica sobre Brucelosis de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.

Volver a: [Enfermedades y problemas reproductivos](#)